Die Bindung von Arzneimitteln an die Plasmaproteine verschiedener Tierarten

GERHARD FRIEMEL

1962

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546010_0013

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München
Direktor: Prof. Dr. M. Kiese

Die Bindung von Arzneimitteln an die Plasmaproteine verschiedener Tierarten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades in der
gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen
Fakultät
der Ludwigs-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von

Gerhard Friemel
aus
München

1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Univ. Doz. Dr. H. Kurz
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. M. Kiese
Dekan:	Prof. Dr. Holle

Tag der mündlichen Prüfung 13. 2. 1968

In Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet

I. Fragestellung und Literaturübersicht

Wirkung, Stoffwechsel und Ausscheidung von Arzneimitteln werden wesentlich von ihrer Verteilung im Organismus beeinflußt. Neben der Speicherung in bestimmten Geweben und der Anreicherung in Organen ist auch die Bindung an die Plasmaproteine von großer Bedeutung. Nachdem diese die pharmakologische Wirkung beeinflußt, muß bei verschiedener Bindung eines Stoffes an die Plasmaproteine auch seine Wirksamkeit verschieden sein. Bestehen speciesbedingte Unterschiede der Bindung, so müßten diese eine verschiedene Wirksamkeit eines Stoffes bei den einzelnen Tierarten zur Folge haben. Deshalb ist es wichtig, die Bindung von Arzneimitteln an die Plasmaproteine verschiedener Tierarten zu kennen.

Zunächst wurde die Bindung von Arzneimitteln nur an den Plasmaproteinen einer Tierart untersucht. Einige Autoren bevorzugten Kaninchenplasma. Andere verwendeten Rinder- oder auch Hundeplasma. Als die Ergebnisse nicht übereinstimmten, interessierte man sich für einen Vergleich der Bindung eines Stoffes an die Plasmaproteine verschiedener Tierarten. Zunächst standen aber nur wenige exakte chemische Nachweismethoden zur Verfügung. Man mußte sich daher biologischer Teste bedienen. So durchströmten FARAH (12), OPPENHEIMER (26) und HOEKSTRA (19) isolierte Froschherzen mit Digitoxinlösungen, die mit Serum verschiedener Tierarten versetzt waren. Um einen systolischen Herzstillstand zu bewirken, war nach Zugabe von Serum eine höhere Digitoxinkonzentration notwendig. Unter der Voraussetzung, daß der an Protein gebundene Anteil pharmakologisch nicht wirksam ist, entspricht die Erhöhung der Digitoxinkonzentration, die einen systolischen Herzstillstand bewirkt, dem Ausmaß der Bindung an die Proteine des zugesetzten Serums. FARAH (12) kontrollierte die so erhaltenen Ergebnisse auch mittels Dialyse. Nach FARAH (12) soll die Bindungsfähigkeit des Plasmas in der Reihenfolge Mensch > Kaninchen > Katze > Ratte > Meerschweinchen > Hund > Frosch abnehmen. Die Mängel der biologischen Bestimmungsmethoden spiegeln sich in den voneinander abweichenden, sich teilweise widersprechenden Ergebnissen wider. Auch ist es nicht geklärt, ob das Verhalten der artfremden Proteine in einem Organ die Versuchsergebnisse beeinträchtigt. Dieselben Einwände gelten für die Versuche, die STORM VAN LEEUWEN (24) anstellte. Er untersuchte die Verminderung der Wirksamkeit von Pilocarpin am Katzendarm durch Einwirkung der Plasmaproteine verschiedener Tierarten. Dabei stellte er fest, daß der Wirkungsverlust, den er der Bindung an die Plasmaproteine zuschrieb, in der Reihenfolge Kaninchen > Katze = Rind > Hund abnahm. Zuverlässiger sind die Bestimmungen der Bindung an die

Plasmaproteine, die LENDLE (25), BEUTNER (4) und HAARMANN (18) durchführten. So fand LENDLE eine Abnahme der Plasmaproteinbindung von Digitoxin, das er mit der Baljet-Reaktion nachwies, in der Reihenfolge Kaninchen > Rind > Katze. BEUTNER (4) gibt für Pilocarpin die Reihenfolge Kaninchen > Ziege > Schaf > Mensch > Pferd > Rind an. Aber auch diese Arbeiten haben nur wenig Aussagekraft über die im lebenden Organismus tatsächlich vorhandenen Bindungsverhältnisse. Das Plasma bzw. Serum wurde nämlich meist nicht frisch und unverdünnt verwendet. Die Konzentrationen der Arzneimittel entsprechen oft nicht therapeutischen Dosen. Außerdem sind die chemischen oder biologischen Bestimmungsmethoden unzuverlässig. Sie ermöglichen keine genaue Angabe des gebundenen Anteils. Aus diesen Gründen lassen sich auch die Einzelergebnisse verschiedener Autoren nicht miteinander vergleichen und zusammenfassen. Neuere Arbeiten, die diese Kriterien berücksichtigen, liegen nur für Penicilline von KEEN (20) und Sulfanilamide von SCHOLTAN (33) vor. Eine vergleichende Darstellung der Bindung an die Plasmaproteine verschiedener Tierarten, die sich nicht nur auf eine bestimmte Stoffgruppe beschränkt, liegt bis jetzt nicht vor und soll Aufgabe dieser Arbeit sein.

II. Methodik

1. Plasma

Bei der Auswahl der Plasmaarten wurden diejenigen Tierarten berücksichtigt, die von anderen Autoren bevorzugt oder öfters zu pharmakologischen Tierversuchen herangezogen wurden. Außer menschlichem Plasma wurde deshalb das Plasma von Rind, Schwein, Hund, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte und Maus verwendet. Das durch Entbluten gesunder, ausgewachsener Tiere erhaltene Blut wurde durch Zusatz von 2ml 33%iger Natriumzitratlösung auf 100ml ungerinnbar gemacht und zentrifugiert. Das so gewonnene Plasma wurde bei +3°C aufbewahrt und möglichst frisch und unverändert verwendet (innerhalb einer Woche).

Die Eiweißkonzentration des Plasmas wurde mit der Biuret-Reaktion nach CORNALL, BARDAWILL und DAVID (10) bestimmt. Die Standardisierung dieser Bestimmungsmethode erfolgte mit Humanalbumin. [1)]

2. Dialyse

Die Bindung der Arzneimittel an die Plasmaproteine wurde mittels Gleichgewichtsdialyse ermittelt. Das Plasma wurde in Dialysierschläuche gefüllt und gegen $\frac{1}{15}$ molarem Phosphatpuffer vom p_H 7,4 dialysiert. Diesem Phosphatpuffer wurde die zu bestimmende Substanz zugesetzt. Dieses Verfahren ist genauer und technisch einfacher als die Zugabe einer Substanzlösung zum Plasma.

Als Dialysierschläuche wurden Cellophanschläuche der Fa. Visking verwendet. Sie besaßen einen Durchmesser von 7 mm und eine mittlere Porenweite von 2,4 nm. Dieser Dialysierschlauch wird vom Hersteller mit einem Imprägnierungsmittel versehen, damit er nicht brüchig wird. Das Imprägnierungsmittel mußte mit destilliertem Wasser herausgewaschen werden, da es bei der Messung der Lichtabsorption im Ultraviolettbereich störte.

Die mehrmals in destilliertem Wasser gewaschenen etwa 30 cm langen Stücke des Dialysierschlauches wurden durch zwei Knoten an einem Ende verschlossen, aufgeblasen und am anderen Ende mit einer Wäscheklammer an einer Leine zum Trocknen aufgehängt. Eine völlige Austrocknung mußte vermieden werden, da sich dabei die Porengröße ändern kann. Deshalb wurden die so vorbereiteten Dialysierschläuche bis zur Verwendung in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Nachdem die Dialysierschläuche mit 5ml Plasma gefüllt worden waren, wurde auch das andere Ende durch zwei Knoten verschlossen. Das so entstandene, straff gefüllte Säckchen wurde an einem Draht aus nicht rostendem Stahl befestigt und in ein Glasröhrchen versenkt, das zuvor mit 7ml $\frac{1}{15}$ molarem Phosphatpuffer vom p_H 7,4 gefüllt worden war. Die Glasröhrchen waren etwa 35 cm lang und besaßen eine lichte Weite von 8 mm. Sie wurden mit einem durchbohrten Plexiglasdeckel verschlossen.

So konnte der Dialysierschlauch am Draht langsam auf und ab bewegt werden. Dadurch strömte die Außenflüssigkeit an der Dialysiermembran vorbei. Es erfolgte eine gute Durchmischung und in Verbindung mit der relativ geringen Schichtdicke eine rasche Einstellung des Dialysegleichgewichtes. Unter diesen Bedingungen stellte sich das Dialysegleichgewicht, wie aus Abb. 2 hervorgeht, bereits nach etwa 6 Stunden ein.

---

1) Albumin aus Humanserum, lyophil., rein,
Fr. 95 % der Firma Serva Entwicklungslabor, Heidelberg

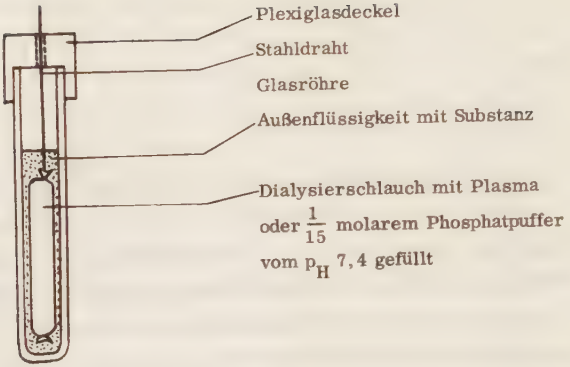

Abb. 1: Dialysiervorrichtung

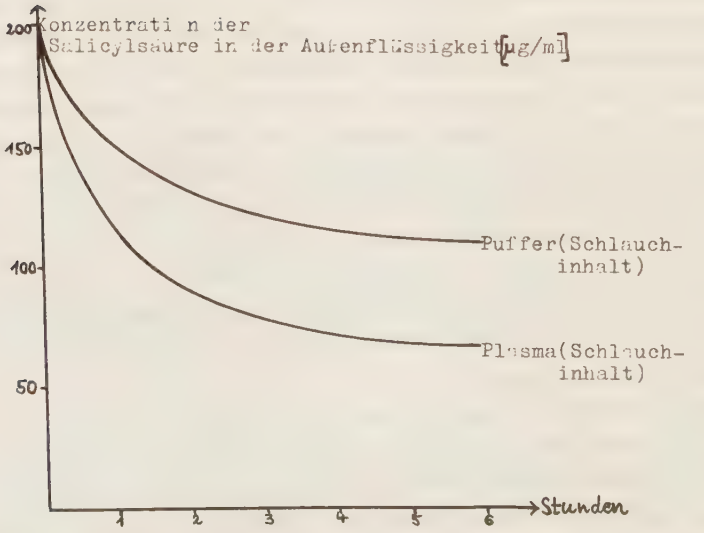

Abb. 2: Einstellung des Gleichgewichtes in der verwendeten Dialysiervorrichtung

Aus technischen Gründen betrug die Dialysierdauer meist 14 bis 16 Stunden (über Nacht). Die Dialyse wurde bei +3°C durchgeführt, um Veränderungen des Plasmas oder der zugefügten Substanz (z. B. enzymatischen Abbau) während dieser Zeit zu verhindern.

3. Substanzen und Bestimmungsmethoden.

Die Bindung von Substanzen an die Plasmaproteine verschiedener Tierarten wurde bei annähernd isomolaren Substanzkonzentrationen (10^{-4} molar) bestimmt. Nur Salicylsäure und ihre Derivate wurden in höherer Konzentration zugesetzt, da ihre Bindung an die Plasmaproteine mit toxischen Dosen in Beziehung gesetzt werden sollte. Die Substanzen, deren Bindung an die Plasmaproteine von Rind, Schwein, Mensch, Hund, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte und Maus bestimmt wurde, sind in Tabelle 1 zusammengestellt

Substanz	Konzentr. µg/ml	Mol. Gew.
1. Anilin	6,5	93
2. Buthalital (Baytinal R)	25,9	262
3. m-Chloranilin	14,3	128
4. Chlorpromazin (Megaphen R)	40,2	355
5. Chinin	37,0	397
6. Dipyridamol (Persantin R)	59,1	504
7. Hexobarbital (Evipan R)	19,0	258
8. Methohexital (Brevimytal R)	30,9	284
9. Nitrofurantoin (Furadantin R)	23,8	238
10. Nitrosalicylsäure	281,8	183
11. p-Aminobenzoesäure	8,7	137
12. Phenylbutazon (Butazolidin R)	39,5	308
13. Pentobarbital (Nembutal R)	21,5	232
14. Salicylamid	194,8	137
15. Salicylsäure	230,0	138
16. Sulfadimethoxin (Madribon R)	40,5	310
17. Sulfaguanidin (Resulfon R)	15,3	214
18. Sulfinpyrazon (Anturan R)	36,9	404

19. Sulfosalicylsäure.....	234,1	218
20. Thiobutabarbital (Inactin R).....	23,5	250
21. Thiopental (Trapanal R).....	21,6	264

Tab. 1: Zusammenstellung der Substanzen, deren Bindung an die Plasmaproteine verschiedener Tierarten bestimmt wurde. Die angegebenen Konzentrationen wurden nach Einstellung des Dialysegleichgewichtes in menschlichem Plasma gefunden.

Die Konzentration der Substanz in der Außenflüssigkeit wurde photometrisch bestimmt. In den meisten Fällen konnte die Messung in der Außenflüssigkeit erst nach Abtrennung von störenden Beimengungen erfolgen. Dazu wurde die zu messende Substanz aus einer Probe der Außenflüssigkeit nach Zugabe von Säure bzw. Lauge in ein Lipoidlösungsmittel (Heptan, Petroläther) extrahiert und anschließend in Lauge bzw. Säure reextrahiert. Im einzelnen wurden folgende Nachweismethoden verwendet:

Thiopental, Thiobutabarbital und Buthalital wurden nach der Methode von BRODIE et al. (6) bestimmt. Methohexital wurde nach der gleichen Methode extrahiert und seine Extinktion bei 243mμ gemessen. Sulfadimethoxin, Sulfaguanidin, Anilin, p-Aminobenzoesäure, und m-Chloranilin wurden nach der Methode von BRATTON und MARSHALL (5) bestimmt. Phenylbutazon und Sulfinpyrazon wurden nach der Methode von BURNS et al. (8) bestimmt. Salicylsäure, Salicylamid und Sulfosalicylsäure geben mit Eisenreagenz [1,2g $Fe(NO_3)_3$ in 10ml 1normaler Salpetersäure] eine Farbreaktion, die eine quantitative Bestimmung durch Messung der Extinktion bei 540mμ ermöglicht. Da Fe^{III} Salze mit Phosphat schwer lösliches Eisenphosphat bilden, das den Nachweis stört, wurde der Phosphatpuffer durch 0,05molaren Trispuffer vom p_H 7,4 ersetzt. Die Farbreaktion des Eisenreagenzes mit dem im Plasma enthaltenen Natriumzitrat wurde durch den entsprechenden Blindwert (s.S. 8) ausgeschaltet. Pentobarbital und Hexobarbital wurden nach der Methode von GOLDBAUM (16) bestimmt. Bei der Pentobarbitalbestimmung wurde die Probe nicht mit 1,5molarem Phosphatpuffer vom p_H 5,5 sondern mit 1 Tropfen konz. Salzsäure angesäuert, um den Blindwert zu erniedrigen. Die Extinktion des Pentobarbitals

wurde bei 240mμ, die des Hexobarbitals bei 245mμ gemessen.

Nitrosalicylsäure, Nitrofurantoin und Dipyridamol besitzen eine Lichtabsorption im sichtbaren Bereich des Lichtes. Diese ist von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig. Um den für den Nachweis optimalen p_H-Wert zu erreichen, wurde Nitrosalicylsäure in 0,5 normaler Natronlauge bei 410mμ Nitrofurantoin nach Zugabe von 0,05 molarer Natriumboratlösung bei 388mμ und Dipyridamol im $\frac{1}{15}$ molaren Phosphatpuffer der Außenflüssigkeit bei 410mμ bestimmt.

Chlorpromazin wurde nach der Methode von SALZMAN und BRODIE (29) bestimmt.

Zur Bestimmung von Chinin wurde 1ml der Außenflüssigkeit mit 1ml 0,1normaler Natronlauge und 20ml Heptan 20 Minuten lang geschüttelt. 15ml der Heptanschicht wurden mit 4ml 0,1normaler Schwefelsäure extrahiert. Die Schwefelsäurephase wurde im Spectrophotofluorometer Aminco Bowman gemessen (Filteranordnung 3, aktivierendes Licht 370mμ, Fluoreszenzlicht 450mμ, Sensitivity 20).

4. Berechnung der Bindung an die Plasmaproteine aus den Meßwerten.

Da eine direkte Bestimmung des an die Plasmaproteine gebundenen Anteils nicht möglich ist, muß dieser mittelbar aus zwei Größen berechnet werden, nämlich dem freien Anteil und der Gesamtkonzentration der Substanz im Plasma. Um diese zu ermitteln, sind die in Tab. 2 angegebenen Ansätze notwendig.

Inhalt des Dialyseschlauches	Außenflüssigkeit	Testsubstanzkonz.	Extinktion der Außenfl.
1. Puffer	Puffer ohne Subst.	---------	E'_O
2. Plasma	Puffer ohne Subst.	---------	E_O
3. Plasma	Puffer mit Subst.	c_1	E_1
4. Puffer	Puffer mit Subst.	c_2	E_2

Tab. 2: Tabelle der erforderlichen Ansätze, sowie der in den folgenden Gleichungen verwendeten Symbole für Konzentrationen und Extinktionswerte. Als Puffer wurde $\frac{1}{15}$ molarer Phosphatpuffer vom p_H 7,4 verwendet.

Mit dem Ansatz Nr. 1 wurde der Blindwert des Puffers, mit dem Ansatz Nr. 2 der Blindwert des Plasmas bestimmt. Ansatz Nr. 3 ergab den freien Anteil der Substanz im Plasma. Aus Ansatz Nr. 4 ließ sich die Gesamtmenge der Substanz im Dialysiersystem ermitteln. Alle Ansätze wurden für jeden Versuch dreimal gemacht, um die Genauigkeit zu erhöhen.

Nach Einstellung des Dialysegleichgewichtes war die Substanz in der Außenflüssigkeit der mit Plasma gefüllten Dialysierschläuche in geringerer Konzentration (c_1) enthalten, als in der Außenflüssigkeit der mit Puffer gefüllten Dialysierschläuche (c_2). Da ein Abbau weitgehend ausgeschlossen wurde und die Adsorption an die Trennmembran minimal war, mußte die Substanz an nicht dialysierbare Bestandteile des Plasmas, nach allgemeiner Auffassung die Plasmaproteine, fixiert sein. Der freie Anteil steht mit dem gebundenen im Gleichgewicht.

Die Konzentration des freien Anteils gleicht aber der Konzentration der Substanz in der Außenflüssigkeit der mit Plasma gefüllten Dialysierschläuche, da die Trennmembran aufgrund ihrer Porengröße nur die Proteinmoleküle zurückhält, für die nicht an Proteinmoleküle gebundenen Arzneimittelmoleküle jedoch kein Hindernis darstellt. Dies konnte durch entsprechende Versuche bestätigt werden.

$$\text{Konzentration des freien Anteils} = c_1$$

Die Gesamtmenge der im Dialysiersystem vorliegenden Substanz ergibt sich aus dem Volumen der Außenflüssigkeit (D), dem Füllvolumen der Dialysierschläuche (S) und der Konzentration der Substanz in der Außenflüssigkeit der mit Puffer gefüllten Dialysierschläuche (c_2).

$$\text{Gesamtmenge im Dialysiersystem} = (D+S) \cdot c_2$$

Die Gesamtmtmenge der im Plasma vorliegenden Substanz (an Protein gebundener + freier Anteil) ergibt sich, wenn man von der Gesamtmenge im Dialysiersystem den in der Außenflüssigkeit der mit Plasma gefüllten Dialysierschläuche abzieht.

$$\text{Gesamtmenge im Plasma} = (D+S) \cdot c_2 - D \cdot c_1$$

Die Gesamtkonzentration der Substanz im Plasma ergibt sich, wenn man die Gesamtmenge der Substanz im Plasma durch das Plasmavolumen dividiert.

$$\text{Gesamtkonzentration im Plasma} = \frac{(D+S) \cdot c_2 - D \cdot c_1}{S}$$

Subtrahiert man von der Gesamtkonzentration der Substanz im Plasma die Konzentration des freien Anteils, so erhält man die Konzentration des gebundenen Anteils.

$$\text{Konzentration des gebundenen Anteils} = \frac{(D+S) \cdot c_2 - D \cdot c_1}{S} - c_1$$

Setzt man die Konzentration des gebundenen Anteils in Beziehung zur Gesamtkonzentration im Plasma und diese gleich 100 %, so erhält man mit

$$B = 100\ \% - 100\ \% \cdot \frac{S \cdot c_1}{(D+S) \cdot c_2 - D \cdot c_1}$$

den prozentualen Anteil der gebundenen Substanz an der Gesamtkonzentration im Plasma.

Die Konzentrationen ergaben sich aus den Extinktionen, wobei von E_1 die Extinktion des Blindwertes E_0 und von E_2 die Extinktion des Blindwertes E_0' abgezogen werden mußte. Da ein Meßbereich eingehalten wurde, in dem die Extinktion der Konzentration der Substanz direkt proportional ist, war es möglich, mit den relativen Werten der Extinktionen zu rechnen. Für die verwendeten Volumina

$$D = 7\text{ml} \qquad \text{und} \qquad S = 5\text{ml}$$

ergibt sich der gebundene Anteil mit

$$B + 100\ \% - 100\ \% \cdot \frac{5 \cdot (E_1 - E_0)}{12 \cdot (E_2 - E_0') - 7 \cdot (E_1 - E_0)}$$

Die Angabe des gebundenen Anteils in Prozenten der Gesamtmenge der Substanz im Plasma, welche die vorausgehende Berechnung notwendig machte, wurde gewählt, da die angegebenen Werte anschaulich und unabhängig von den Volumina im Dialysiersystem sind.

III. Ergebnisse

1. Arteigene Bindung

Die erhaltenen Werte der Bindung an die Plasmaproteine verschiedener Tierarten sind in der Tabelle 3 zusammengefaßt.

	Rind	Schwein	Mensch	Hund	Kaninchen	Meerschweinch.	Ratte	Maus	Konz µg/ml
Anilin	37,8 ± 0,6	31,2 ± 0,6	37,3 ± 1,6	30,1 ± 0,6	38,7 ± 1,5	55,8 ± 1,6	32,3 ± 0,8	31,5 ± 1,1	6,5
Buthalital	87,3 ± 0,4	68,3 ± 1,1	76,1 ± 0,5	59,5 ± 1,3	84,9 ± 0,4	83,9 ± 0,6	84,9 ± 0,4	72,0 ± 1,5	25,9
m-Chloranilin	87,3 ± 0,8	81,4 ± 0,3	87,3 ± 0,5	81,8 ± 0,9	85,9 ± 0,4	94,0 ± 0,9	79,1 ± 0,5	65,8 ± 1,0	14,3
Chlorpromazin	95,1 ± 0,8	95,1 ± 1,4	96,9 ± 0,4	92,9 ± 0,4	93,2 ± 0,9	94,6 ± 0,4	96,5 ± 0,3	97,0 ± 0,2	40,2
Chinin	50,5 ± 0,6	38,0 ± 0,8	70,6 ± 1,0	51,3 ± 2,5	61,1 ± 0,7	86,7 ± 1,7	64,0 ± 0,7	30,9 ± 1,8	37,0
Dipyridamol	81,7 ± 0,4	88,5 ± 0,8	90,9 ± 1,4	87,9 ± 0,1	96,2 ± 0,1	86,3 ± 1,1	92,0 ± 0,9	91,2 ± 0,6	59,1
Hexobarbital	51,6 ± 1,5	45,4 ± 0,8	54,8 ± 1,6	55,4 ± 0,8	71,8 ± 1,2	66,2 ± 1,5	54,2 ± 0,9	52,5 ± 1,5	19,0
Methohexital	75,2 ± 0,6	72,4 ± 1,1	83,9 ± 0,8	68,0 ± 0,6	93,4 ± 0,4	92,5 ± 0,7	86,3 ± 0,6	84,5 ± 0,3	30,9
Nitrofurantoin	51,9 ± 0,9	50,2 ± 1,2	77,1 ± 1,4	45,3 ± 1,6	73,7 ± 1,0	61,0 ± 1,6	73,2 ± 1,7	58,0 ± 1,3	23,8
Nitrofurantoin (+Salicylsäure)	39,8 ± 2,8	41,0 ± 1,0	69,9 ± 1,4	33,3 ± 1,4	70,1 ± 0,4	45,8 ± 0,7	61,8 ± 0,3	36,3 ± 1,0	23,8 (230,0)
Nitrosalicylsäure	94,5 ± 0,3	89,5 ± 0,2	98,4 ± 0,1	83,1 ± 0,5	96,7 ± 0,2	92,2 ± 0,2	90,4 ± 0,2	88,8 ± 0,1	281,8
p-Aminobenzoesäure	31,7 ± 1,2	35,9 ± 1,1	22,8 ± 1,1	6,7 ± 1,5	54,5 ± 1,3	40,1 ± 1,3	6,4 ± 1,2	1,9 ± 1,2	8,7
Phenylbutazon	99,1 ± 0,2	97,4 ± 0,3	98,8 ± 0,4	87,3 ± 1,0	96,5 ± 0,3	98,3 ± 0,3	92,4 ± 1,2	86,2 ± 0,7	39,5
Pentobarbital	64,0 ± 1,2	53,0 ± 1,4	63,2 ± 1,8	53,8 ± 1,4	65,5 ± 0,4	65,5 ± 0,8	59,4 ± 0,4	60,8 ± 0,8	21,5
Salicylamid	50,8 ± 1,2	52,7 ± 1,0	65,9 ± 0,9	34,8 ± 1,6	68,7 ± 1,0	61,0 ± 0,4	41,7 ± 0,8	40,5 ± 1,6	194,8
Salicylsäure	64,8 ± 1,2	74,6 ± 0,8	82,1 ± 0,8	53,6 ± 1,8	84,9 ± 0,4	72,4 ± 1,4	60,8 ± 1,0	55,4 ± 0,1	230,0
Sulfadimethoxin	98,0 ± 0,3	96,5 ± 0,3	99,1 ± 0,1	95,5 ± 0,2	98,6 ± 0,4	99,2 ± 0,5	99,7 ± 0,1	98,5 ± 0,4	40,5
Sulfadimethoxin (+Salicylsäure)	72,8 ± 1,0	73,4 ± 0,4	89,8 ± 0,2	65,9 ± 0,3	95,6 ± 0,4	92,3 ± 0,4	90,2 ± 0,2	88,4 ± 0,2	40,5
Sulfaguanidin	28,6 ± 1,0	24,7 ± 1,1	29,2 ± 1,0	13,4 ± 1,1	50,0 ± 1,7	42,5 ± 1,9	40,4 ± 1,1	32,7 ± 1,3	15,3
Sulfinpyrazon	90,8 ± 0,2	90,3 ± 0,2	93,0 ± 0,3	86,1 ± 0,8	95,9 ± 0,7	93,4 ± 0,4	93,4 ± 0,5	92,3 ± 0,9	36,9
Sulfosalicylsäure	62,8 ± 1,0	73,5 ± 0,7	83,8 ± 1,6	52,7 ± 0,7	85,1 ± 0,4	71,6 ± 0,5	61,9 ± 0,8	54,5 ± 0,9	234,1
Thiobutabarbital	79,7 ± 1,7	74,1 ± 1,1	71,8 ± 0,6	62,3 ± 0,4	85,5 ± 1,0	81,8 ± 1,0	75,3 ± 0,9	74,1 ± 0,9	23,5
Thiopental	84,1 ± 0,5	80,1 ± 0,5	87,2 ± 0,1	76,9 ± 0,5	89,6 ± 0,8	84,6 ± 0,8	90,2 ± 0,2	86,4 ± 0,1	21,6
Proteinkonzentr.	6,71	6,59	7,49	6,13	7,21	5,74	7,11	6,12	–
Albuminkonz.	41,0	42,4	61,5	43,0	66,8	55,8	54,3	48,0	–

Tab. 3: Zusammenstellung der ermittelten Bindungswerte. Die Werte geben den

gebundenen Anteil in Prozenten der Gesamtkonzentration an. Die angegebene Streuung ist die des Mittelwertes. Als Konzentrationen sind diejenigen angegeben, die nach Einstellung des Dialysegleichgewichtes in menschlichem Plasma gefunden wurden. Die Proteinkonzentration ist in Gewichtsprozenten angegeben. Die Werte wurden durch Biuret-Reaktion nach CORNALL, BARDAWILL und DAVID (10) ermittelt. Die Albuminkonzentration ist in Prozenten der Gesamtproteinkonzentration angegeben. Sie wurde von SCHERMER (32) und GOETZE (14) übernommen.

Die Ergebnisse zeigen, daß das Ausmaß der Bindung von Arzneimitteln an die Plasmaproteine verschiedener Tierarten sehr verschieden sein kann. Die großen Unterschiede erlauben es, von einer arteigenen Bindung zu sprechen. Die Streuung des Mittelwertes ist mit 1 bis 2 % gering. Diese geringe Streuung sichert die gefundenen Unterschiede und zeigt, daß die individuellen Schwankungen innerhalb einer Tierart gering sind. Größere Unterschiede sind hier auch gar nicht zu erwarten, da die physiologischen Schwankungen der Plasmaproteinkonzentration zu klein sind, um einen merklichen Einfluß auf die Bindung zu haben.
Es gibt keine Tierart, deren Plasma für alle Substanzen die höchste bzw. niedrigste Bindung aufweist. Auch kann das Verhältnis des Bindungsvermögens zweier Plasmaarten nicht von einem Stoff auf einen anderen übertragen werden. So bindet Rinderplasma 87,3 % des Buthalitals, aber nur 64,8 % der Salicylsäure. Schweineplasma bindet dagegen 68,3 % des Buthalitals, aber 74,6 % der Salicylsäure. Auch chemisch verwandte Stoffe (Barbiturate, Thiobarbiturate) oder Stoffgruppen wie Säuren bzw. Basen oder gut bzw. schlecht lipoidlösliche Stoffe zeigen keine einheitliche Reaktion gegenüber dem Plasma verschiedener Tierarten.

2. Kompetitive Bindung bei verschiedenen Tierarten

Nachdem sich bei den einzelnen Tierarten Unterschiede der Bindung einer Substanz an die Plasmaproteine ergaben, wurde untersucht, ob solche Speziesunterschiede auch bei der kompetitiven Bindung vorhanden sind. Gibt man zwei Substanzen gleichzeitig die Möglichkeit, sich an Proteine anzulagern, so beeinflussen sie ihre Bindung gegenseitig. Je nach der Affinität der Substanz zum Plasmaprotein und dessen Bindungsvermögen wird eine Substanz die andere verdrängen oder selbst verdrängt werden. Zur

Untersuchung dieser Verdrängung mußten Stoffpaare gefunden werden, die völlig unabhängig voneinander quantitativ bestimmt werden können. Dies ist der Fall für Sulfadimethoxin (BRATTON-MARSHALL-Reaktion) bzw. Nitrofurantoin (Extinktion bei 388mμ) und Salicylsäure (Farbreaktion mit Eisenreagenz). Es ist anzunehmen, daß nahezu jede Substanz eine andere aus ihrer Bindung an die Plasmaproteine verdrängen kann. Von pharmakologischem Interesse ist dieser Effekt aber nur, wenn er bei Konzentrationen auftritt, die zumindest unter der Letaldosis liegen. Die Konzentrationsabhängigkeit dieses Verdrängungseffektes zeigt die Abb. 3.

Abb. 3: Verdrängung von Sulfadimethoxin (40,5μg/ml) aus der Bindung an Plasmaproteine verschiedener Tierarten durch Salicylsäure. Bei steigender Salicylsäurekonzentration wurde der gebundene Anteil des Sulfadimethoxins bestimmt.

Dabei zeigt das Plasma der einzelnen Tierarten eine verschieden starkte Freisetzung des gebundenen Anteils von Sulfadimethoxin. So erhöht sich der freie Anteil des Sulfadimethoxins durch Zugabe von Salicylsäure in einer Konzentration von 230μg/ml

im Rinderplasma	von	2,0 %	auf	27,2 %	um das	13,6fache
im Schweineplasma	von	3,5 %	auf	26,6 %	um das	7,6fache
im Menschenplasma	von	0,9 %	auf	10,2 %	um das	11,3fache
im Hundeplasma	von	4,5 %	auf	34,1 %	um das	7,6fache
im Kaninchenplasma	von	1,4 %	auf	4,4 %	um das	3,1fache
im Meerschw. plasma	von	0,8 %	auf	7,7 %	um das	9,6fache
im Rattenplasma	von	0,3 %	auf	9,8 %	um das	3,3fache
im Mäuseplasma	von	1,5 %	auf	12,6 %	um das	8,4fache

Ähnliches gilt für die Freisetzung von Nitrofurantoin aus seiner Bindung an die Plasmaproteine durch Salicylsäure. So erhöht sich der freie Anteil des Nitrofurantoins nach Zugabe von Salicylsäure in einer Konzentration von 230µg/ml

im Rinderplasma	von	48,1 %	auf	60,2 %	um das	1,25fache
im Schweineplasma	von	49,8 %	auf	59,0 %	um das	1,18fache
im Menschenplasma	von	22,9 %	auf	30,1 %	um das	1,31fache
im Hundeplasma	von	54,7 %	auf	66,7 %	um das	1,21fache
im Kaninchenplasma	von	26,3 %	auf	29,9 %	um das	1,13fache
im Meerschw. plasma	von	39,0 %	auf	54,2 %	um das	1,38fache
im Rattenplasma	von	26,8 %	auf	38,2 %	um das	1,42fache
im Mäuseplasma	von	42,0 %	auf	63,7 %	um das	1,51fache

Die Bindung von Salicylsäure an die Plasmaproteine wurde durch Sulfadimethoxin bzw. Nitrofurantoin in den angegebenen Konzentrationen nicht wesentlich beeinflußt. Dies gilt für alle Plasmaarten.

3. Einfluß des Alters der Tiere auf die Bindung an die Plasmaproteine

Da die Zusammensetzung des Plasmas vom Alter der Versuchstiere abhängig ist, könnte dadurch auch die Proteinbindung verändert werden. Deshalb wurde die Bindungsfähigkeit des Plasmas junger und ausgewachsener Tiere miteinander verglichen. Dabei wurde die Bindung von Anilin, Nitrofurantoin und Thiopental an die Plasmaproteine nicht nur bei ausgewachsenen Tieren, sondern auch bei 100 g schweren

Meerschweinchen und 500 g schweren Kaninchen (4 bis 5 Wochen alt) bestimmt.

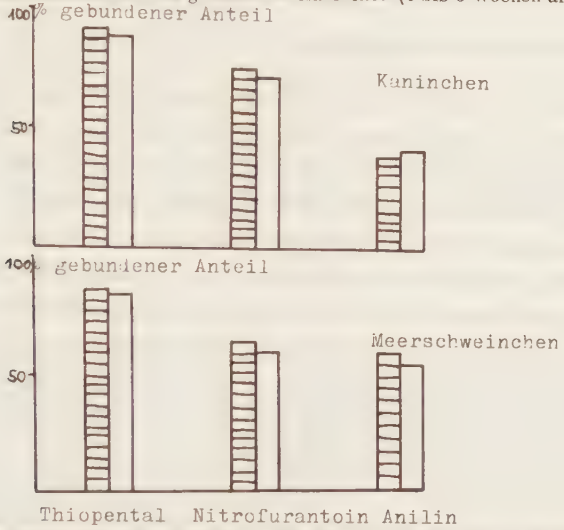

Abb. 4: Abhängigkeit der Bindung an die Plasmaproteine vom Alter der Tiere. Die Werte gelten für

ausgewachsene Kaninchen bzw. Meerschweinchen

500 g schwere Kaninchen (4 bis 5 Wochen alt)

100 g schwere Meerschweinchen (4 bis 5 Wochen alt)

Zwischen beiden Altersstufen ergaben sich nur geringe Unterschiede. Diese lagen aber im Bereich der Streuung. Geringe Schwankungen des Alters der Tiere beeinflussen das Bindungsvermögen ihrer Plasmaproteine also nicht, da selbst jugendliche Tiere keine wesentlich andere Proteinbindung zeigten als ausgewachsene Tiere.

IV. Diskussion

1. Bestimmung der Proteinbindung durch Dialyse

Bei der Untersuchung einer relativ labilen Beziehung, wie der Bindung eines Stoffes an die Plasmaproteine, darf der Meßvorgang das Gleichgewicht dieser Beziehung nicht oder nur unbedeutend stören. Deshalb sind zur Bestimmung der Bindung an die Plasmaproteine manche früher benützten Methoden wie Eiweißfällung, Elektrophorese und auch die sogenannten biologischen Methoden ungeeignet. Heute werden vor allem Gelfiltration, Ultrafiltration, Ultrazentrifugation und Dialyse angewendet. Seitdem BRUCK (7) bei der Ultrafiltration eine wechselnde, nicht voraussehbare Abdichtung des Filters durch Proteinmoleküle fand, wird auch diese Methode als weniger geeignet betrachtet. Dies bestreitet jedoch RIEDER (27), der eine besondere Anordnung der Ultrafiltration verwendet. Auch die übliche Durchführung der Gelfiltration läßt nach SCHOLTAN (39) keine quantitativen Angaben über die Größe der Eiweißbindung zu.
KURZ und TRUNK (22) untersuchten die Fehler der verschiedenen Bestimmungsmethoden (Ultrafiltration, Dialyse und Ultrazentrifugation), die bereits bei proteinfreien Lösungen auftreten. Dabei zeigte die Dialysenmethode den geringsten Fehler. Doch auch sie hat Mängel und Fehler, die GARN und KIMBEL (13) angeben mit:

1. Adsorption der Substanz an die Trennmembran
2. Donnan-Effekt
3. Veränderung der Eiweißkonzentration
4. Veränderung der Substanzkonzentration
5. Blockade der Membranpassage durch Proteinmoleküle

Durch die hier angewendete Methode der Dialyse wurden diese Fehlermöglichkeiten weitgehend ausgeschaltet.

1. Die Adsorption der Substanz an die Trennmembran ist gering und wurde durch den entsprechenden Kontrollansatz korrigiert.
2. Der Donnan-Effekt ist nahezu ohne Einfluß auf die Verteilung der Substanz im Dialysiersystem, da gegen einen Puffer mit einem p_H in der Nähe des isoelektrischen Punktes der Plasmaproteine dialysiert wurde (GARN und KIMBEL 13).

3. Eine Änderung der Proteinkonzentration während der Dialyse durch Einströmen von Wasser trat nicht auf, da sich das Plasma im geschlossenen, straff gefüllten Dialysierschlauch befand. So ergaben Wägungen vor und nach der Dialyse, daß sich das Gewicht des gefüllten Dialysierschlauches während der Dialyse nicht geändert hatte.

4. Die Konzentration der Substanz im Plasma steigt mit zunehmender Bindung an die Plasmaproteine. Die Ergebnisse werden dadurch aber kaum beeinflußt (s. S. 19).

5. Eine Blockade der Membranpassage erfolgte nicht. Dies wurde dadurch nachgewiesen, daß sich auch bei Zugabe der Substanz zum Plasma im Dialysierschlauch dasselbe Gleichgewicht einstellte wie nach üblicher Zugabe zum Dialysat.

Da das angegebene Verfahren gut reproduzierbare Werte der Bindung von Stoffen an die Plasmaproteine in therapeutischen Konzentrationen ergibt und SCHOLTAN (35) nachweisen konnte, daß die Bindung an die Plasmaproteine in vivo nicht anders ist als in vitro, dürften die erhaltenen Ergebnisse den tatsächlichen Bindungsverhältnissen im lebenden Organismus nahe kommen.

2. Abhängigkeit der Bindung von der Substanzkonzentration

Die Bindung von Substanzen an die Plasmaproteine kann durch die Freundlich'sche bzw. Langmuir'sche Adsorptionsisotherme beschrieben werden. Es ist verständlich, daß bei einer so großen Oberfläche wie sie Proteinmoleküle besitzen, Adsorptionsvorgänge eine wesentliche Rolle spielen. Doch auch für eine chemische Bindung konnte SCHOLTAN (40) eine Beziehung ableiten, die der Langmuir'schen Adsorptionsisotherme entspricht:

$$\text{Protein } [P] + \text{Substanz } [S] \rightleftharpoons PS$$

$$K = \frac{[PS]}{[P] \cdot [S]} \quad (1)$$

Unter der Annahme, daß jedes Proteinmolekül n bindende Gruppen besitzt, kann die Bindung der Substanz pro Proteinmolekül ($\bar{r}$) ausgedrückt werden mit

$$\bar{r} = \frac{n \cdot [PS]}{[P] + [S]} \quad (2)$$

Setzt man die Gleichung 1 in die Gleichung 2 ein, so ergibt sich

$$\bar{r} = \frac{n \cdot K[P][S]}{P + K[P][S]} \qquad \bar{r} = \frac{n \cdot K[S]}{1 + K[S]}$$

$$\bar{r} = n \cdot K[S] - \bar{r} \cdot K[S]$$

Ist die Anzahl der bindenden Gruppen (n) sehr groß gegenüber der Bindung der Substanz pro Proteinmolekül, also r n, so kann r · K S vernachlässigt werden und es gilt

$$\bar{r} = n \cdot K[S] \qquad \text{oder} \quad \log \bar{r} = \log K + \log n \cdot [S]$$

Da in dieser Gleichung der gebundene Anteil in einer linearen Abhängigkeit von der Substanzkonzentration steht, ergibt sich eine sogenannte "Bindungsgerade" (SCHOLTAN 33). Dies gilt allerdings nur für den Bereich, der Substanzkonzentration, für den die Bedingung r n erfüllt ist. Diese Abhängigkeit der Bindung von der Substanzkonzentration zeigt die Adsorptionsisotherme in Abbildung 5.

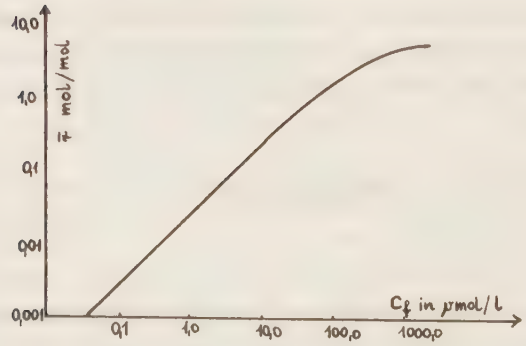

Abb. 5: Konzentrationsabhängigkeit des spez. Bindungsvermögens für die Bindung von Phenoxymethylpenicillin an Humanserum. Nach Scholtan (23).

Für den annähernd geraden Abschnitt der Adsorptionsisotherme gilt die Gleichung log r = log K + log n * S. Die Forderung r n ist somit erfüllt. Für diesen Bereich ist die Bindung eines Stoffes an die Plasmaproteine in der gewählten Angabe in Prozenten der Gesamtkonzentration nahezu konstant. Denn die Konzentration des gebundenen Anteils ist in diesem Bereich der Gesamtkonzentration annähernd proportional. Dieser Bereich entspricht bei vielen Substanzen der therapeutischen Konzentration. Er wurde bei der Bestimmung der Bindung einer Substanz an die Plasmaproteine weitgehend eingehalten.

4. Einfluß der Proteinkonzentration auf die Bindung

Erst wenn die Bedingung r n nicht mehr erfüllt ist, hängt das Ausmaß der Bindung von der Konzentration im Plasma ab. Das Verhältnis r zu n wird aber nicht nur durch die Substanzkonzentration bestimmt, sondern auch durch die Proteinkonzentration des Plasmas. Diese Abhängigkeit der Bindung von der Plasmaproteinkonzentration zeigt die Abbildung 6.

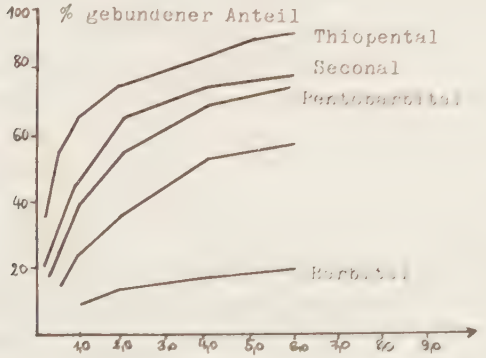

Abb. 6: Abhängigkeit der Bindung verschiedener Stoffe an Rinderalbumin von der Proteinkonzentration. Die Verdünnung erfolgte mit $\frac{1}{15}$ molarem Phosphatpuffer vom p_H 7,4. Die Barbituratkonzentration war 0,001 M. Abb. nach GOLDBAUM (17).

Aus dem Verlauf der Kurven in Abbildung 6 wird ersichtlich, daß Schwankungen der Proteinkonzentration, wie sie physiologischerweise vorkommen, sowie die Verdünnung durch Natriumzitratlösung, nur geringen Einfluß auf das Ausmaß der Bindung haben.

Aus diesen Gründen und wegen der großen Anzahl der Versuche zeigen die gefundenen Werte eine geringe Streuung. Außerdem hat die Substanzkonzentration keinen wesentlichen Einfluß auf das Ausmaß der Bindung (in Prozenten der Gesamtkonzentration), wenn der oben beschriebene Konzentrationsbereich eingehalten wird. Dies ermöglicht es erst, die Bindung einer Substanz an die Plasmaproteine verschiedener Tierarten zu vergleichen. Die Konzentration der Substanz, die sich nach der Gleichgewichtseinstellung im Plasma findet, ist nämlich vom Ausmaß der Bindung an die Plasmaproteine abhängig. Je stärker das Ausmaß der Bindung ist, umso höher wird die Substanzkonzentration im Plasma. So können sich auch bei gleicher Ausgangskonzentration der Substanz durch verschieden hohe Proteinbindung verschieden hohe Substanzkonzentrationen im Plasma einstellen. Diese unterscheiden sich aufgrund der verwendeten Volumina jedoch maximal um den Faktor 2,4. Wollte man die Bindung an die Plasmaproteine bei allen Tierarten bei genau derselben Konzentration der Substanz bestimmen, müßte man die umständliche Kompensationsdialyse durchführen. Bei ihr wird die an Plasmaprotein gebundene Substanz durch weitere Substanzzugabe ersetzt, bis die gewünschte Konzentration eingestellt ist. Dies ist aber nicht notwendig, da im angegebenen Bereich der Substanzkonzentration diese noch keinen wesentlichen Einfluß auf das Ausmaß der Bindung hat.

4. Arteigene Bindung

Das Plasma der einzelnen Tierarten kann Stoffe in sehr verschiedenem Ausmaß binden. Das Verhältnis des Bindungsvermögens zweier Plasmaarten kann aber nicht von einem Stoff auf einen anderen übertragen werden. Da nach ANTON (1), GARN und KIMBEL (13), SCHOLTAN (33), BENNHOLD (3), GOLDSTEIN (15) und vielen anderen die Albumine ein besonders großes Bindungsvermögen für viele Stoffe besitzen, wäre ein Zusammenhang zwischen der Proteinbindung und der Albuminkonzentration bei den einzelnen Tierarten zu erwarten, falls keine qualitativen Unterschiede zwischen

den Albuminen bei den einzelnen Tierarten bestehen. Ein solcher Zusammenhang konnte aber nur für wenige Stoffe z. B. Nitrofurantoin nachgewiesen werden.

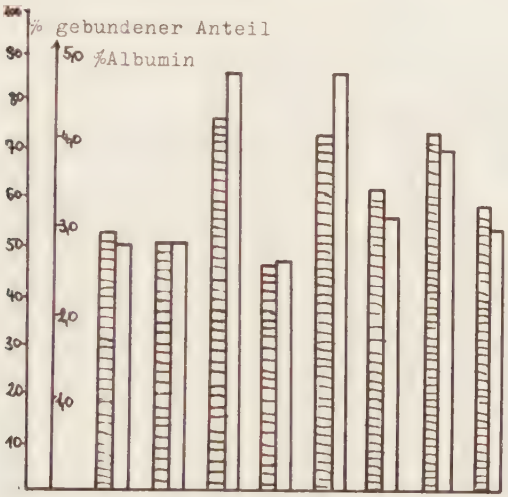

Abb. 7: Beziehung zwischen der Bindung von Nitrofurantoin (▣) an das Plasma verschiedener Tierarten und dessen absoluter Albuminkonzentration (□).

Zwischen der Bindung einer Substanz an die Plasmaproteine verschiedener Tierarten und den Konzentrationsunterschieden einer einzelnen Plasmaproteinfraktion, wie α-, ß oder γ-Globulin konnte kein Zusammenhang festgestellt werden.

Daß die Bindung der meisten Stoffe weder der Albuminkonzentration allein entspricht, dürfte darauf zurückzuführen sein, daß neben den Albuminen auch andere Plasmaproteinfraktionen in verschieden hohem Ausmaß bestimmte Stoffe binden können.

So fanden GARN und KIMBEL (13) und andere eine nicht unbeträchtliche Bindung der Sulfonamide an das γ-Globulin.

Um die Besonderheiten, die die Bindung des einzelnen Stoffes an die Plasmaproteine bestimmen, auszuschließen, wurde ein mittleres Bindungsvermögen berechnet. Dieses besteht aus dem Mittelwert der Bindungswerte für alle 21 Stoffe. Ordnet man dieses mittlere Bindungsvermögen den Plasmaalbumin- bzw. Proteinkonzentrationen zu, so

ergibt sich eine gewisse Übereinstimmung, die in Abbildung 8 dargestellt ist.

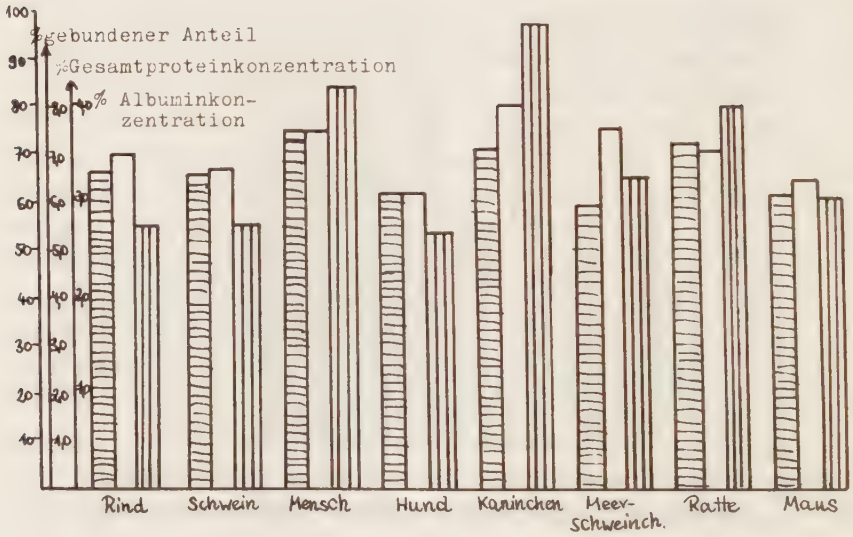

Abb. 8: Vergleich des mittleren Bindungsvermögens (Mittelwert der Bindungserte von 21 Stoffen) mit den absoluten Protein- und Albuminkonzentrationen des Plasmas

1. Gesamtproteinkonzentration
2. Mittleres Bindungsvermögen
3. Albuminkonzentration

In dieser Abbildung zeigt das mittlere Bindungsvermögen mit Ausnahme von Kaninchen und Meerschweinchen eine Übereinstimmung mit den Plasmaproteinkonzentrationen. Beim Meerschweinchen, weniger stark auch beim Kaninchen ist das mittlere Bindungsvermögen größer als es der Proteinkonzentration entspricht. Die Übereinstimmung mit der Albuminkonzentration des Plasmas ist weniger ausgeprägt. Hier fällt auf, daß

besonders globulinreiche Plasmaarten (Rind, Schwein und Meerschweinchen) ein höheres mittleres Bindungsvermögen besitzen als es der Albuminkonzentration entspricht. In Abbildung 9 wurde das mittlere Bindungsvermögen gegen die Summe von Albumin und Globulin aufgetragen.

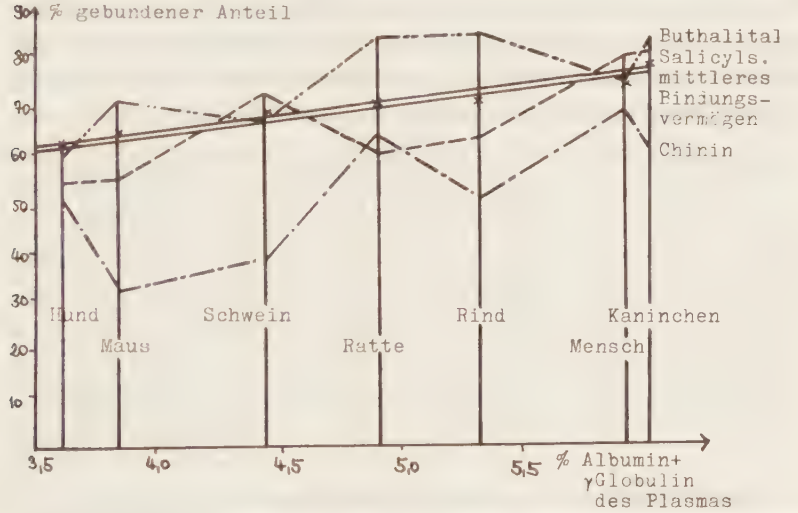

Abb.9: Vergleich des mittleren Bindungsvermögens (Mittelwert der Bindungswerte von 21 Stoffen) (═══) mit der Bindung von Butnalital (—·—), Salicylsäure (- - -) und Chinin (—··—) an die Plasmaproteine verschiedener Tierarten. Der gebundene Anteil ist gegen die Summe der absoluten Konzentrationen des Albumins und γGlobulins des Plasmas aufgetragen.

Dabei zeigt sich, daß das mittlere Bindungsvermögen zunimmt je größer die Summe beider Proteinfraktionen (Albumin + Globulin) wird. Die Abhängigkeit des mittleren Bindungsvermögens von der Proteinkonzentration ist der Abhängigkeit der Bindung von Thiopental von der Proteinkonzentration in Abbildung 6 ähnlich. Das weist darauf hin, daß die Unterschiede des mittlerem Bindungsvermögens bei den einzelnen Tierarten wahrscheinlich durch die verschiedenen Proteinkonzentrationen bedingt sind. Dies gilt aber nur für das mittlere Bindungsvermögen, nicht für die Bindungswerte der einzelnen Substanzen (gestrichelte Linien in Abbildung 9). Da aber das mittlere Bindungsvermögen der Mittelwert der Bindungswerte der einzelnen Sub-

stanzen ist, müssen auch bei diesen die verschiedenen Proteinkonzentrationen der Plasmaarten von derselben Bedeutung sein. Dies wird jedoch durch andere Faktoren überdeckt, die später besprochen werden sollen.

Die gefundenen Unterschiede der Bindung an die Plasmaproteine verschiedener Tierarten stimmen mit den Ergebnissen von SCHOLTAN (33) und ANTON (1) überein. Bei ANTON fällt die geringe Bindungsfähigkeit des Mäuseplasmas auf. SCHOLTAN (33) gibt für 3 Sulfonamide folgende Reihenfolge der steigenden Bindung an:

Sulfadiazin	2-Sulfanilamido -5-methyl-oxypyrimidin	Sulfadimethoxin
Maus	Rind	Maus
Hund	Hund	Ratte
Rind	Ratte	Hund
Kaninchen	Maus	Rind
Ratte	Mensch	Kaninchen
Mensch	Kaninchen	Mensch

Die Reihenfolge des Zunahme des Bindungsvermögens ist für die angegebenen 3 Sulfonamide nicht einheitlich. So bindet Rattenplasma Sulfadiazin stärker als Rinderplasma, dieses bindet aber Sulfadimethoxin stärker als Rattenplasma.
KEEN (20) berichtet dagegen für 3 verschiedene Penicilline die einheitliche Reihenfolge Schwein, Schaf, Rind, Ziege, Pferd. Dem widersprechen jedoch die Ergebnisse von ROLINSON und SUTHERLAND (28). Sie fanden bei Anordnung der Tierarten nach steigender Bindung des Penicillins für Cloxacillin und Benzylpenicillin verschieden Reihenfolgen. Auch die Einzelwerte unterscheiden sich erheblich. So gibt KEEN (20) die Bindung von Benzylpenicillin beim Pferd mit 62,1 % an, während beim Schaf nur 42,2 % des Benzylpenicillins gebunden sind. ROLINSON und SUTHERLAND (28) fanden für Benzylpenicillin beim Pferd ebenfalls 59,0 % gebundenen Anteil, beim Schaf aber den sehr viel höheren Wert von 70,0 %.
Nach Abschluß vorliegender Arbeit wurden von STURMAN und SMITH (42) Untersuchungen über die Bindung von Salicylsäure an die Plasmaproteine verschiedener Tierarten veröffentlicht. Obwohl die Reihenfolge der Tierarten bei Anordnung nach steigender Bindung mit den hier beschriebenen etwa übereinstimmt, unterscheidet sich doch

doch die Größe der Einzelwerte sehr erheblich von den in dieser Arbeit angegebenen. STURMAN und SMITH (42) benützten die Gelfiltration mit einer Menge von 0,1ml Plasma. SCHOLTAN (39) schreibt jedoch, daß selbst bei Anwendung der üblichen Flüssigkeitsvolumina (1 bis 3 ml) mit dieser Methode keine quantitativen Angaben über die Größe der Eiweißbindung gemacht werden können. SCHOLTAN (39) fordert daher die Verwendung großer Volumina (50ml und mehr), um exakte Werte der Proteinbindung zu erhalten. Es ist sehr wahrscheinlich, daß diese Abweichungen von unseren Werten durch Anwendung einer ungeeigneten Methode entstanden sind. Wie erheblich die ermittelten Unterschiede der Bindung bei den einzelnen Tierarten sind, wird ersichtlich, wenn man nicht die gebundenen, sondern die freien Anteile vergleicht, die nach allgemeiner Anschauung allein pharmakologisch wirksam sein sollen. So ist der freie Anteil des Buthalitals im Hundeplasma mit 40,5 % mehr als dreimal so groß wie im Rinderplasma (12,7 %). Der freie Anteil des Methohexitals ist im Rattenplasma mit 13,7 % doppelt so groß, in menschlichem Plasma mit 16,6 % zweienhalbmal so groß, im Rinderplasma mit 24,8 % etwa viermal so groß und im Hundeplasma mit 32,0 % gar fünfmal so groß wie im Kaninchenplasma (6,6 %). Diese Verhältnisse sind in Abbildung 10 dargestellt.

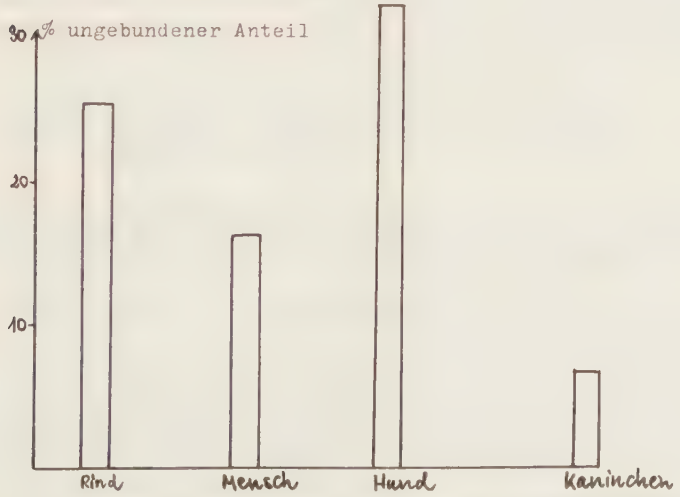

Abb. 10: Der nicht gebundene Anteil des Methohexitals im Plasma von Rind, Mensch, Hund und Kaninchen

Auch bei Substanzen, bei denen keine großen Unterschiede zwischen der Bindung bei verschiedenen Tierarten vorhanden sind, können speziesbedingte Unterschiede auftreten, wenn diese Substanzen durch eine zweite aus ihrer Bindung verdrängt werden. So erhöht sich der freie Anteil des Sulfadimethoxins im Hundeplasma nach Zugabe von Salicylsäure etwa um das achtfache, im Rinderplasma gar um das 14fache, im Kaninchenplasma dagegen nur um das dreifache. Der freie Anteil des Sulfadimethoxins im Rinderplasma, der etwa ebenso groß ist wie im Kaninchenplasma, ist nach Zugabe von Salicylsäure etwa sechsmal so groß wie im Kaninchenplasma.
Sowohl bei Sulfadimethoxin als auch bei Nitrofurantoin ist die Verdrängung aus der Bindung durch Salicylsäure im Menschen- und Kaninchenplasma am geringsten, im Hundeplasma am stärksten. Entsprechend der Bindung einzelner Substanzen ist aber auch bei der Verdrängung von Stoffpaaren kein einheitliches Verhalten der verschiedenen Plasmaarten zu erwarten. Wahrscheinlich steigt mit der Konzentration der Substanzen der Einfluß der höheren Proteinkonzentration im Menschen- und Hundeplasma.
Die Unterschiede der Bindung von Stoffen an die Plasmaproteine verschiedener Tierarten können durch viele Faktoren bedingt sein. Verschiedene Protein- und Albuminkonzentrationen der Plasmaarten sind sicher nicht die alleinige Ursache, da das Bindungsvermögen nicht für alle Stoffe in der gleichen Reihenfolge der Tierarten abnimmt. Wohl ist ihr Einfluß darin zu erkennen, daß das eiweißreiche Kaninchen- und Menschenplasma durchschnittlich höhere Bindungswerte aufweist (mittleres Bindungsvermögen) als das eiweißärmere Mäuse- und Hundeplasma. Die sehr verschiedene Bindung der Stoffe an die Plasmaproteine der einzelnen Tierarten kann aber mit den Unterschieden der Protein- und Albuminkonzentrationen allein nicht erklärt werden.
In Coeruleoplasmin, Apoferritin u. a. wurden Proteine mit speziellem Bindungsvermögen gefunden. Es ist nicht auszuschließen, daß es auch für andere Stoffe Proteine mit besonderen Bindungseigenschaften gibt. Durch verschiedene Konzentrationen solcher Proteine bei den einzelnen Plasmaarten könnten Unterschiede im Bindungsvermögen zustande kommen.
Aber auch die üblicherweise im Plasma vorkommenden Proteine könnten durch Abweichung ihrer Struktur arteigene Unterschiede der Proteinbindung bedingen. Neben der Sequenz der Aminosäuren und andere Anteilen der einzelnen Komponenten wird dabei besonders die räumliche Anordnung der Sekundär- und Tertiärstruktur eine wichtige Rolle spielen.

Überdies bestehen viele Möglichkeiten der Bindung an die Plasmaproteine, die auch nebeneinander verwirklicht sein können. Neben elektrostatischer Anlagerung (Ionenbindung, Wasserstoffbrücken, Bindung zwischen Dipolen) wird auch die Möglichkeit einer kovalenten Bindung diskutiert (SCHOLTAN 36). Da die Proteine aber Kolloide mit einer großen Oberfläche sind, wird für die meisten Stoffe eine Adsorption für wahrscheinlich betrachtet. Die Bindung kann dabei durch van der Waal sche Kräfte zustande kommen. Andererseits können auch hydrophobe Stoffe in das Innere von Proteinmolekülen eindringen, wo sich deren hydrophobe Regionen befinden. Die Proteinmoleküle können dadurch ihre Struktur reversibel ändern, was SCHOLTAN (38) nachweisen konnte. Daneben existieren für einzelne Stoffe spezielle Bindungsvorstellungen. So soll beispielsweise Phenybutazon an Plasmaproteine über Zinkionen gebunden sein.

Ursache der verschieden hohen Bindung bei den einzelnen Tierarten könnte auch das Vorliegen eines oder mehrerer Stoffe im Plasma sein, die den zu untersuchenden Stoff kompetitiv aus seiner Bindung an die Plasmaproteine verdrängen. Neben vielen anderen körpereigenen Stoffen (Cholesterin, Hormone, Bilirubin) kämen auch die Plasmaproteine selbst in Frage. So konnte SCHOLTAN (40) zeigen, daß γ-Globuline das Bindungsvermögen von Albuminen vergrößern, aber auch verkleinern können. Die Frage nach der Art der Bindung führt somit in die Chemie der Proteinmoleküle.

7. Einfluß der Bindung eines Stoffes an die Plasmaproteine auf seine pharmakologische Wirksamkeit

Die Unterschiede der Bindung von Arzneimitteln an die Plasmaproteine verschiedener Tierarten haben große Bedeutung für die allgemeine und experimentelle Pharmakologie.

Das Ausmaß der Bindung eines Stoffes an die Plasmaproteine läßt sich nicht von einer Tierart auf eine andere oder den Menschen übertragen. Die experimentellen Ergebnisse sind nur für die Tierart zutreffend, deren Plasma verwendet wurde. Für Tierversuche sollte die Bindung an das Plasma der Tierart ermittelt werden, die zu Versuchen herangezogen wird. Rinderplasma, das leicht zu gewinnen ist und deshalb oft benützt wird, kann in der Pharmakologie meist nur zu Vorversuchen herangezogen werden, da das Rind als Versuchstier wenig gebräuchlich ist. Tierversuche, deren Ergebnisse auf den Menschen übertragen werden sollen, sollten möglichst an Tieren

vorgenommen werden, deren Plasma ähnliche Bindungsverhältnisse aufweist wie menschliches Plasma.

Da die angegebenen Werte der Bindung auch im lebenden Organismus gelten, könnten sich aus der verschiedenen Bindung bei den einzelnen Tierarten Unterschiede der Wirkungsstärke von Arzneimitteln ableiten. Über die Bedeutung der Bindung eines Stoffes an die Plasmaproteine für seine pharmakologische Wirkung, Stoffwechsel und Ausscheidung liegen nur relativ wenige Untersuchungen vor. Lediglich für Sulfanilamide (DAVIS 11), Penicilline (KUNIN 21) und andere antibakterielle Arzneimittel ist nachgewiesen, daß der gebundene Anteil nicht bakteriostatisch wirksam ist. Nach CHOW (9) sollen Penicilline jedoch auch an Plasmaprotein gebunden wirksam sein, während ihre Ausscheidung durch die Bindung verlangsamt wird. Auch die Depotwirkung einiger Sulfanilamide wird ihrer starken Bindung an die Plasmaproteine zugeschrieben. SCHULZE (39) fand nach experimenteller Lebercirrhose eine schnellere Ausscheidung von Arzneimitteln, die er einer verminderten Bindung an die Plasmaproteine zuschrieb. LASSER (23) fand eine Verlängerung der Pentobarbitalnarkose durch Verdrängung des Pentobarbitals aus seiner Bindung an die Plasmaproteine durch Urokon. Dieser Effekt ergab sich aber nur bei Ratten, nicht bei Kaninchen. Wahrscheinlich ist das Kaninchen nicht für Narkoseversuche weniger geeignet, wie LASSER glaubt, sondern es tritt im Kaninchenplasma erst bei einer höheren Konzentration eine kompetitive Verdrängung auf, wie es auch aus der Abbildung 3 ersichtlich ist. So nimmt der freie Anteil des Sulfadimethoxins nach Zugabe von Salicylsäure im Kaninchenplasma um das 3,1fache, im Rattenplasma dagegen um das 32,6fache zu.

Die Bedeutung der Bindung eines Stoffes an die Plasmaproteine für das Schicksal der Stoffe im Organismus wird aber ersichtlich, wenn man diese Bindung im Rahmen der Verteilung eines Stoffes im Gesamtorganismus betrachtet.
Jeder Stoff muß, um seine pharmakologische Wirkung zu entfalten, mit bestimmten Rezeptoren reagieren. Diese mehr oder weniger feste Fixation ist die Grundlage jeder pharmakologischen Wirkung. Es gibt eine große Anzahl von Rezeptoren, die sich aber meist außerhalb der Blutbahn befinden. Will ein Stoff mit diesen Rezeptoren reagieren, so muß er die Blutbahn verlassen. Das kann er aber nicht, wenn er an Proteinmoleküle gebunden ist. Die Bindung an die Plasmaproteine beeinflußt somit die Wirkung vieler Arzneimittel, aber auch körpereigener Stoffe. Dies geht auch aus dem Schema von GOLDSTEIN (15) hervor.

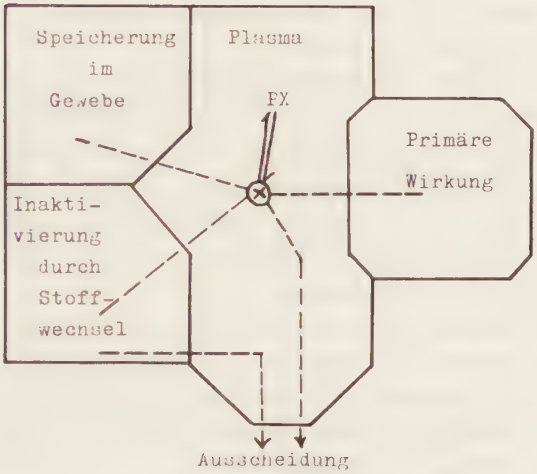

Abb. 11: Einfluß der Bindung an Plasmaproteine auf Wirkung, Speicherung, Stoffwechsel und Ausscheidung. Schema nach GOLDSTEIN (15).

Die Bindung an die Plasmaproteine bestimmt somit gemeinsam mit der Gesamtkonzentration die Konzentration des freien Anteils. Diese ist aber gleich der Konzentration im interstitiellen Raum, da die Kapillarmembran nur Proteinmoleküle, jedoch nicht Moleküle mit kleinem Molekulargewicht, wie Arzneimittelmoleküle zurückhält. Sollten aber auch Proteinmoleküle mit relativ kleinem Molekulargewicht passieren können und der an sie gebundene Stoff durch geänderte Bedingungen (p_HWert, kompetitive Verdrängung) freigesetzt werden, so steht der freie Anteil im Gleichgewicht mit dem freien Anteil im Plasmawasser und kann nie größer werden als dieser. Die Bindung an die Plasmaproteine beeinflußt somit an zentraler Stelle die Verteilung eines Stoffes im Organismus und muß deshalb bedeutenden Einfluß auf Stoffwech-

sel, Wirkung, Speicherung und Ausscheidung haben. Die Bedeutung geht also über die von BENNHOLD (2) erkannte Transportfunktion hinaus. Sie experimentell zu bestätigen ist aber sehr schwierig, da die Bindung im lebenden Organismus verändert werden müßte. Dies könnte durch Erzeugung einer experimentellen Hypo- oder Dysproteinämie oder Verdrängung durch eine zweite, pharmakologisch wenig wirksame Substanz aus der Bindung an die Plasmaproteine geschehen.

Noch schwieriger ist es aber, den Einfluß der verschiedenen Bindung bei den einzelnen Tierarten aufzuzeigen. Theoretisch wäre eine Abnahme der Wirksamkeit mit steigender Bindung an die Plasmaproteine zu erwarten. Diese Auswirkungen können aber leicht durch verschiedene Resorption, Stoffwechselvorgänge, Speicherung, Entgiftung und Ausscheidung überdeckt werden. Eine direkte Abhängigkeit der Wirksamkeit eines Stoffes von seiner Bindung an die Plasmaproteine kann daher nicht erwartet werden und dürfte sich nur für bestimmte Fälle ergeben.

So wird die relativ langsame Ausscheidung von Phenylbutazon mit seiner hohen Bindung an die Plasmaproteine erklärt, da weniger stark gebundene Pyrazolone, wie Amidopyrin und Antipyrin rascher eliminiert werden. Die von VOGEL, HAUFE und RICHARZ (43) angegebene Ausscheidung von Phenylbutazon bei Ratte und Maus stimmt gut mit den verschieden hohen Bindungswerten überein.

Auch die sehr langsame Ausscheidung beim Menschen läßt sich mit der hohen Bindung (98, 8 %) in Einklang bringen.

Für Chlorpromazin stimmen die von SCHENKER (31) mitgeteilten Werte der LD_{50} mit dem ungebundenen Anteil im Plasma überein.

	Ungebundener Anteil	LD_{50}
Maus	3, 0 %	50 mg/kg
Ratte	3, 5 %	25 mg/kg
Kaninchen	5, 4 %	15 mg/kg

Je größer der freie Anteil des Chlorpromazins im Plasma ist, umso kleiner wird die LD_{50}. Diese Übereinstimmung ist deshalb besonders auffällig, weil Mäuseplasma nur Chlorpromazin stärker bindet als Kaninchenplasma. Dieses bindet alle anderen Stoffe in größerem Ausmaß als Mäuseplasma.

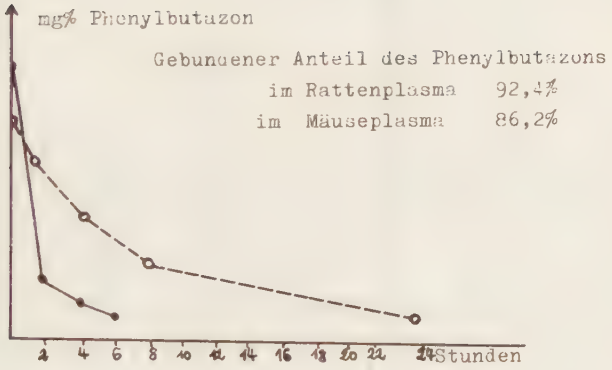

Abb. 12: Konzentration von Phenylbutazon im Blut der Ratte (•-•) bzw. Maus (•-•) nach einer Gabe von 75 mg/kg bzw. 110 mg/kg i. v. nach VOGEL, HAUFE und RICHARZ (43)

Relativ einfach sind die Verhältnisse bei der Salicylsäure. Sie wird nach enteraler Gabe rasch und vollständig resorbiert. Der intermediäre Stoffwechsel ist unbedeutend. Die Ausscheidung erfolgt bei allen Tierarten fast ausschließlich durch die Niere als unverändertes Salicylat, mit Aminoessigsäure gekoppelt als Salicylursäure und in geringerem Ausmaß als Glucuronid. Die Koppelung erfolgt in der Niere, da im Blut nie Konjugationsprodukte nachgewiesen werden konnten. Nach peroraler Zufuhr erreicht der Blutspiegel rasch hohe Werte. Durch die Bindung an die Plasmaproteine wird die freie Konzentration im Blut vermindert. Da sich das Ausmaß der Bindung bei den einzelnen Tierarten erheblich unterscheidet, müßten bei gleicher "Empfindlichkeit" die Letaldosen verschieden groß sein. Je größer der freie, pharmakologisch wirksame Anteil ist, umso kleiner müßte die Letaldosis sein.

In Abb. 13 ist der freie Anteil der Salicylsäure im Plasma mit dem reziproken Wert der LD_{50} verglichen. Für Rind, Schwein und Mensch konnten in der Literatur keine Letaldosen gefunden werden. Die angegebenen LD_{50} wurden von SCHERMER (30) übernommen.

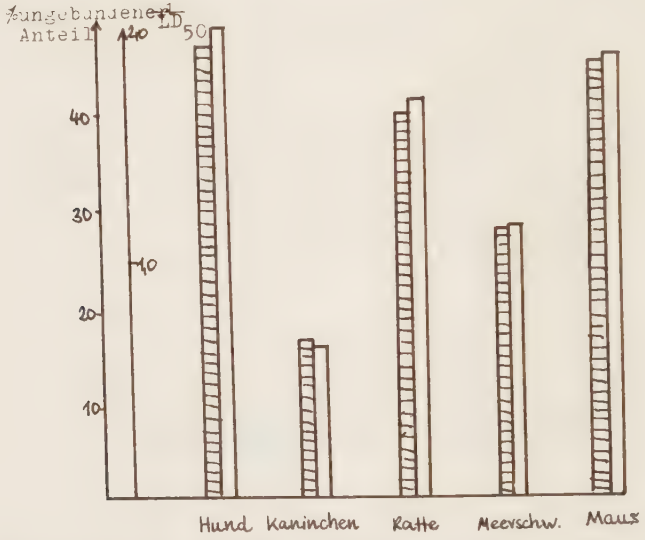

Abb. 13: Beziehung zwischen dem ungebundenen Anteil im Plasma (▤) und der LD_{50} für Salicylsäure (▯). Der reziproke Wert der LD_{50} entspricht weitgehend dem ungebundenen Anteil im Plasma.

Unter der Annahme, daß für Salicylsäure die Konzentration im Blut der verabfolgten Dosis annähernd entspricht, ergäbe sich für Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen und Hund nach verabreichter Letaldosis die gleiche Konzentration der freien Salicylsäure im Blut. Die Unterschiede der Letaldosen, die für Kaninchen immerhin dreimal so groß ist wie für den Hund, lassen sich somit sehr gut aufgrund der verschiedenen Bindung an die Plasmaproteine erklären. Ein Zusammenhang zwischen der verschieden großen Letaldosis und der verschieden hohen Plasmaproteinbindung ist deshalb anzunehmen.

Auch für andere Stoffe kann ein ähnlicher Zusammenhang erhoben werden. Eine unmittelbare Beziehung ist aber schwer aufzuzeigen, da sie durch andere Unterschiede zwischen den Tierarten überdeckt sein kann. Dennoch sollte die verschieden hohe Bindung an die Plasmaproteine bei den einzelnen Tierarten stets beachtet werden, besonders wenn man Befunde an verschiedenen Tierarten vergleichen oder Ergebnisse von einer Tierart auf eine andere übertragen will.

V. Zusammenfassung

1. Die Bindung von 21 Stoffen an die Plasmaproteine von Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Hund, Mensch, Rind und Schwein wurde durch Gleichgewichtsdialyse in einer besonderen Anordnung bestimmt.

2. Während die individuellen Schwankungen gering sind, ergeben sich erhebliche Unterschiede der Bindung bei den einzelnen Tierarten (arteigene Proteinbindung).

3. Das mittlere Bindungsvermögen (Durchschnitt der Bindungswerte für 21 Stoffe) nimmt in der Reihenfolge Kaninchen, Meerschweinchen, Mensch,Ratte, Rind, Schwein, Maus und Hund ab. Betrachtet man aber die Bindung der einzelnen Stoffe, so kommen sehr große Abweichungen von dieser Reihenfolge vor.

4. Es gibt keine Gruppe von Stoffen (Säuren, Basen, gut oder schlecht lipoidlösliche Stoffe u. a.), die den Plasmaproteinen verschiedener Tierarten gegenüber einheitlich reagiert. Selbst chemisch nahe verwandte Stoffe können bei den einzelnen Tierarten sehr verschieden gebunden werden.

5. Eine Übertragung der Bindungswerte von einer Tierart auf eine andere ist nicht möglich.

6. Auch die Verdrängung aus der Bindung an die Plasmaproteine durch eine zweite Substanz erfolgt bei den einzelnen Tierarten sehr verschieden.

7. Die Bedeutung des verschiedenen Bindungsvermögens des Plasmas verschiedener Tierarten, sowie seine möglichen Ursachen werden diskutiert.

VI. Literaturverzeichnis

1. ANTON, A. H.: The relation between the binding of sulfonamides to albumin and their antibacterial efficacy. J. Pharmacol. Exper. Therap. 129, 282 (1960)

2. BENNHOLD, H., KYLIN, E. und RUSZYAK, St.: Die Eiweißkörper des Blutplasmas. Verlag Theodor Steinkopff, Leipzig und Dresden (1938)

3. BENNHOLD, H.: Über die Bedeutung der Serumeiweißkörper für Transportvorgänge im lebenden Organismus. Antibiotika und Chemotherapie 12, 1 (1964)

4. BEUTNER, R.: The binding power of serum for drugs tested by a new in vitro method. J. Pharmacol. Exper. Therap. 25, 365 (1925)

5. BRATTON, A.C. und MARSHALL, E.K.JR.: A new coupling component for sulfanilamid determination. J. biol. Chem. 128, 537 (1939)

6. BRODIE, B.B. MARC, L.C., PAPPER, E.M., LIEF, P.A., BERNSTEIN, E. und ROVINSTINE, E.A.: The fate of thiopental in man and a method for its estimation in biological material. J. Pharmacol. Exper. Therap. 98, 85 (1950)

7. VOM BRUCK, C.G. und KUHNE, J.: Zur Bestimmung der Eiweißbindung der Sulfonamide mittels der Ultrafiltermethode. Arzneimittel-Forsch. 12, 1116 (1962)

8. BURNS, J.J., ROSE, R.K. CHENKIN, Th., GOLDMAN, A., SCHULERT, A. und BRODIE, B.B.: The physiological disposition of phenylbutazone in man and a method for its estimation in biological material. J. Pharmacol. Exper. Therap. 109, 346

9. CHOW, B. F. und MC KHEE, Cl. M: Interaction between crystalline penicillin and human plasma proteins. Science, 101, 67 (1945)

10. CORNALL, A. G., BARDAWILL, C. J. und DAVID, M. M: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. biol. Chem. 177, 751 (1949)

11. DAVIS B. D. und WOOD, W. B. JR.: Studies on antibacterial action of sulfonamide drugs. Correlation of drug activity with binding to plasma proteins. Pro. Soc. Exper. Biol. Med. 51, 283 (1942)

12. FARAH, A.: On the combination of some cardioactive glycosides with serum proteins. J. Pharmacol. Exper. Therap. 83, 143 (1945)

13. GARN, F. W. und KIMBEL, K. H.: Verbleib und Ausscheidung von Depotsulfonamiden. Arzneimittel-Forsch. 11, 701 (1961)

14. GOETZE, E.: Lehrbuch der pathologischen Physiologie VEB Gustav Fischer Verlag, Jena (1962)

15. GOLDSTEIN, A.: The interaction of drugs and plasma proteins. Pharmacol. Rev. 1, 102 (1949)

16. GOLDBAUM, L. R.: An ultraviolett spectrophotometric procedure for the determination of barbiturates. J. Pharmacol. Exper. Therap. 94, 68 (1948)

17. GOLDBAUM, L. R. und SMITH, P. K.: The interaction of barbiturates with serum albumin and its possible relation to their disposition and pharmacological actions. J. Pharmacol. Exper. Therap. 111, 197 (1954)

18. HAARMAN, W.: Hagemeier, A. und LENDLE, L.: Über die Bindung von Digitalisglykosiden an die Eiweißstoffe des Blutserums. Arch. exper. Path. Pharmak. 194, 205 (1940)

19. HOEKSTRA, R.A.: Das Verhalten von Digitalisglykosiden in Blut und Gewebeflüssigkeit. Arch. exper. Path. Pharmak. 162, 649 (1931)

20. KEEN, P.: The bindung of three penicillins in the plasma of several mammalian species as studied by ultrafiltration at body temperature. Brit. J. Pharmacol. 26, 507 (1965)

21. KUNIN, C.M: Clinical pharmacology of the new penicillins. The importance of serum protein binding in determining antimicrobial activity and concentration in serum. Clin. Pharmacol. Therap. 7, 166 (1966)

22. KURZ, H. und TRUNK, H.: Some interfering factors in determining the protein-bound fraction of chemotherapeutics. Vortrag V. Internationaler Kongreß für Chemotherapie, Wien, 1967

23. LASSER, E. ELIZONDO-MARTEL, G. und GRAUKE, R.: Potentation of pentobarbital anaesthesia by competitive protein binding. Anaesthesiology, 24, 665 (1963)

24. STORM VAN LEEUWEN, W.: On the influence of colloids on the action of noncolloidal drugs. J. Pharmacol. Exper. Therap. 17, 1 (1921)

25. LENDLE, L. und PUSCH, P.: Über die Bindung der Digitaliskörper an die Eiweißstoffe des Blutes. Arch. Exper. Pharmak. 177, 550 (1935)

26. OPPENHEIMER, E.: Zur Frage der Fixation der Digitaliskörper im tierischen Organismas und besonders deren Verhalten im Blut. Biochem. Zschr. 55, 134 (1913)

27. RIEDER, J.: Prüfung der Ultrafiltrationsmethode zur Bestimmung der Eiweißbindung von Pharmaka mittels radioaktiver Präparate. Vortrag V. Internationaler Kongreß für Chemotherapie, Wien (1967)

28. ROLINSON, G. und SUTHERLAND, R.: The binding of antibiotics to serum protein. Brit. J. Pharmacol. 25, 638 (1965)

29. SALZMAN, N. und BRODIE, B. B.: Physiological disposition and fate of chlorpromazin and a method for its estimation in biological material. J. Pharmacol. Exper. Therap. 188, 46 (1956)

30. SCHENK, O.: Die Salicylsäure Verlag Dr. Werner Saenger, Berlin, 1947

31. SCHENKER, E.: Phenothiazine und Azaphenothiazine als Heilmittel. Drug Research VolV, 269 (1963)

32. SCHERMER, S.: Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere. Johannes Ambrosius Barth Verlag, Leipzig (1954)

33. SCHOLTAN, W.: Die Bindung der Langzeitsulfonamide an die Eiweißkörper des Plasmas. Arzneimittel-Forsch. 11, 707 (1961)

34. SCHOLTAN, W. und SCHMID, J.: Die Bindung der Penicilline an die Eiweißkörper des Serums und des Gewebes.
Arzneimittel-Forsch. 12, 741 (1962)

35. SCHOLTAN, W.: Die Bindung der Antibiotika an die Eiweißkörper des Serums.
Arzneimittel-Forsch 13, 347 (1963)

36. SCHOLTAN, W.: Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper.
Arzneimittel-Forsch. 14, 469 (1964)

37. SCHOLTAN, W.: Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper.
Arzneimittel-Forsch 14, 1139 (1964)

38. SCHOLTAN, W.: Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper.
Arzneimittel-Forsch 14, 1234 (1964)

39. SCHOLTAN, W.: Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper.
Arzneimittel-Forsch. 15, 1433 (1965)

40. SCHOLTAN, W.: Über die Bindung der Langzeitsulfonamide an Serumeiweißkörper.
Die Makromolekulare Chemie 54, 24 (1962)

41. SCHULZE, G.: Über die Sulfonamidbindungsfähigkeit des Blutes.
Klin. Wschr. 33, 686 (1955)

42. STURMAN, J.A. und SMITH, M.H.: The binding of salicylate to plasma proteins in different species.
J. Pharmacol. Pharmac. Vol. 19, 621 (1967)

43. VOGEL, J. HAUFE, H. und RICHARZ, G.: Tierexperimentelle Untersuchungen über die Wirkungsdauer von Phenylbutazon.
Arch. Internat. pharmacodyn therap. 161, 144 (1966)

44. WALLENFELS, K. und SUND, H.: Zum Wirkungsmechanismus des 3,5-Dioxo-1,2diphenyl-4nbutylpyrazolidins. Arzneimittel-Forsch. 9, 81 (1959)

Für die Themenstellung, Anleitung sowie die kritische Beurteilung danke ich Herrn Univ. Doz. Dr. med. H. Kurz.

Lebenslauf

Als fünftes Kind des Studienprof. Franz-Josef Friemel und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Haunschild wurde ich am 23. 1. 1942 in Wohlau geboren. Mein Vater war an der Oberrealschule dieser schlesischen Kreisstadt tätig.

1945 mußten wir Schlesien verlassen und fanden in einem Dorf bei Berlin Unterkunft. 1947 gelang es meinem Vater unsere Familie in Regensburg zusammenzuführen.

Hier trat ich 1948 in die Volksschule und 1952 in die Oberrealschule ein, an der ich 1961 das Abitur ablegte.

1961 immatrikulierte ich mich an der Universität München für das Fach Medizin. 1963 legte ich die ärztliche Vorprüfung ab. Die ärztliche Prüfung bestand ich am 25. Juli 1967.

Vom 1. August 1967 bis 30. 11. 1967 war ich als Medizinalassistent am Pharmakolog. Institut der Universität München tätig. Seit 1. 12. 1967 bin ich am Städt. Krankenhaus in Bad Aibling als Medizinalassistent tätig.